

重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶对猪全层皮肤缺损创面修复的影响

刘彤 郑兴锋 李海航 金剑 贵驰 朱世辉



作者简介:刘彤,女,1992年出生,海军军医大学第一附属医院2016级硕士研究生,主要研究方向为危重症烧伤救治、创面修复与皮肤组织工程。

【摘要】 目的 观察重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶用于治疗猪全层皮肤缺损创面,在创面愈合和血管新生,新生真皮胶原排列状态和胶原比例等方面的影响。**方法** 将重组人Ⅲ型胶原蛋白粉末与海藻酸钠粉末以质量比10:1混合,溶于无菌磷酸盐缓冲液中,制备成胶原蛋白含量为10%的溶液,使用时以10% Ca^{2+} 溶液交联成凝胶状。以巴马小型猪作为实验动物制备动物模型,在每头猪背部正中中线两侧旁开2 cm分别用手术刀制备3个边长5 cm深达肌肉筋膜的长方形全层皮肤缺损创面,采用自体自身对照,实验组用重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶治疗,水凝胶外层覆盖无菌硅胶膜保湿;阳性对照组用可吸收性敷料治疗;阴性对照组仅用无菌硅胶膜覆盖。术后7、14、21、90 d,进行创面大体观察,并取材行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察创面修复情况、炎症反应,免疫组织化学染色法检测创面CD31的表达并计数新生血管数目,天狼猩红饱和苦味酸染色偏振光观察胶原纤维排列、Ⅲ型胶原蛋白比例。实验数据比较采用单因素方差分析、SNK- q 检验或Kruskal Wallis H 检验。**结果** 实验组创面肉芽组织平整,颜色鲜红,柔软湿润。光学显微镜下见实验组较阴性对照组组织炎症反应轻微,创面修复早期肉芽组织生长速度快。CD31免疫组织化学染色结果显示,术后7、14、21 d,实验组新生毛细血管数分别为 (18.8 ± 2.7) 、 (32.0 ± 4.4) 、 (42.8 ± 4.5) 个/hpf,而阴性对照组仅分别为 (12.0 ± 3.0) 、 (16.6 ± 2.3) 、 (12.6 ± 4.1) 个/hpf,各个时间点实验组新生毛细血管数均高于阴性对照组,差异均有统计学意义(P 值均小于0.05)。术后14、21、90 d创面新生真皮组织天狼猩红饱和苦味酸染色结果显示,实验组较阴性对照组胶原纤维排列规整,与阳性对照组相似,而Ⅲ型胶原蛋白比例较阴性和阳性对照组均升高。**结论** 重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶可促进全层创面愈合和血管新生,促进新生真皮组织胶原纤维有序排列,增加Ⅲ型胶原在新生真皮胶原中所占比例,从而改善创面愈合质量,并有望减轻创面愈合后的瘢痕形成。

【关键词】 肉芽组织; 伤口愈合; 血管化; 重组人Ⅲ型胶原蛋白; 胶原纤维

Effect of recombinant human type-Ⅲ collagen hydrogels on wound healing of pig full-thickness skin defects Liu Tong, Zheng Xingfeng, Li Haihang, Jin Jian, Ben Chi, Zhu Shihui. Department of Burns Surgery, Institute of Burns, First Affiliated Hospital of Navy Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Zhu Shihui, Email: doctorzhushihui@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of recombinant human type-Ⅲ collagen hydrogels on wound healing and vascularization, collagen fiber arrangement, and type-Ⅲ collagen proportion during pig full-thickness skin defect wound healing. **Methods** The recombinant human type-Ⅲ collagen powder was

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2019.02.004

基金项目:全军“十二五”重大项目(AWS14C001)

作者单位:200433 上海,海军军医大学第一附属医院烧伤外科,全军烧伤研究所

通信作者:朱世辉,Email:doctorzhushihui@163.com

mixed with sodium alginate powder in mass ratio 10:1 and dissolved in aseptic phosphate buffer saline to prepare a solution of 10% collagen content. 10% Ca^{2+} solution was used to crosslink the above mixed solution to form gelatin when used. Bama miniature male pigs ($n=3$) were used as experimental animal to prepare animal models. In each pig, three square-shaped full-thickness skin defect wounds were made on both sides of the back. Each pig served as its own control. Tissues in the experimental group were treated with recombinant human type-III collagen hydrogel and covered with sterile silicone membranes for moisturizing. Positive control tissues were treated with absorbable dressing, and negative control tissues were covered with sterile silicone membranes only. On postoperative days 7, 14, 21, and 90, wounds were grossly observed and specimens collected to assess wound repair and inflammatory responses using hematoxylin-eosin staining under a microscope. CD31 expression and regenerated blood vessel counts were measured immunohistochemically. The collagen fiber arrangement and type-III collagen proportion were observed using picrosirius red staining under a polarized light microscope. The experimental data were compared by one-way ANOVA, SNK- q test or Kruskal Wallis H test. **Results** Granulation tissues in the experimental group were smooth, bright red, soft, and moist. Inflammatory responses were reduced and early granulation tissue growth rate was elevated in the experimental group compared to those in the control groups. On postoperative days 7, 14 and 21, CD31 expression revealed that the number of new capillaries in the experimental group was (18.8 ± 2.7) , (32.0 ± 4.4) and $(42.8 \pm 4.5)/\text{hpf}$ respectively, while that in the negative control group was (12.0 ± 3.0) , (16.6 ± 2.3) and $(12.6 \pm 4.1)/\text{hpf}$, respectively. The number of new capillaries in the experimental group was higher than that in the negative control group at each time point. The differences were statistically significant (with P values below 0.05). The collagen fibers in the experimental group exhibited better arrangement than those in the negative control group, and comparable to the positive control group. Moreover, a higher type-III collagen proportion was found in the experimental group than in the positive and negative control groups at 14, 21 and 90 days after surgery according to picrosirius red staining. **Conclusions** Recombinant human type-III collagen hydrogel promotes wound healing, induces angiogenesis, promotes collagen fiber better arrangement in regenerated dermal tissues, and increases the type-III collagen proportion in regenerated dermal tissues during the process of wound healing. These benefits could improve wound healing and may reduce scar formation after wound healing.

【Key words】 Granulation tissue; Wound healing; Neovascularization; Recombinant human type-III collagen; Collagen fiber

在严重创伤和大面积烧伤患者创面修复过程中,真皮组织的再生和重建,与创面愈合速度、创面愈合质量、瘢痕增生程度密切相关。水凝胶类创面敷料性状与细胞外基质相近,具有三维网状立体结构,透气性好,能够快速吸水、锁水,早期可吸收创面渗液,后期为创面提供湿润的修复环境,加快创面愈合速度^[1-2],被视为临床应用价值较高的材料^[3]。而胶原蛋白由于具备抗原性弱,利于细胞黏附,可诱导细胞增殖、分化,可为细胞长入、胶原沉积和新血管形成提供支架^[4],其降解产物也可为创面修复提供必须的氨基酸^[5]等优势,因而成为制备创面敷料的重要材料。成人皮肤组织以I型、III型胶原蛋白为主,I型胶原蛋白比例较高,而无瘢痕愈合的胎儿皮肤组织中III型胶原蛋白比例明显较成人高,因而提高III型胶原蛋白比例有望增加皮肤弹性,减轻瘢痕增生^[6]。本研究将重组人III型胶原蛋白水凝胶用于治疗猪全层皮肤缺损创面,观察其对创面愈合和血管新生,对新生真皮组织胶原排列和胶原比例等方面发挥的影响。

材料与方法

一、实验试剂、仪器与动物来源

1. 主要试剂与仪器:ReCollagen 重组人III型胶原(江苏悦智生物医药有限公司,胶原含量>90%,批号:20180823);海藻酸钠粉末(美国Aldrich公司,货号:180947-500G);可吸收性敷料(日本郡是株式会社);无菌硅胶膜(瑞典Molnlycke公司);猪CD31抗体(美国Abcam公司,货号:ab28364);苦味酸-天狼猩红染色试剂盒(美国Abcam公司,货号:ab150681);磷酸缓冲溶液(上海博光生物科技有限公司)。ZX-LGJ-1型冷冻干燥机(上海知信实验仪器技术有限公司);JSM-6701F型扫描电子显微镜(日本电子株式会社);光学显微镜(德国Leica公司);电子天平(上海精密仪器仪表有限公司)。

2. 实验动物:雄性健康清洁级巴马小型猪3只,6个月龄,体重10~15 kg,购自海军军医大学动物实验中心,实验动物生产许可证编号:SCXK(沪)2015-0005。单笼饲养,恒定室温,采用12 h光照、

12 h 黑暗环境模拟昼夜交替。

二、实验方法

1. 水凝胶的制备:用电子天平称取重组人Ⅲ型胶原蛋白粉末 5.0 g 和海藻酸钠粉末 0.5 g,⁶⁰钴辐照灭菌后以 50 mL 无菌磷酸盐缓冲液溶解,搅拌均匀成水溶液。密封后 -4 ℃ 保存备用。

2. 动物模型制备、分组及处理:小型猪术前 12 h 禁食,4 h 禁水,称取体重,术前 30 min 阿托品 0.05 mg/kg、盐酸赛拉嗪注射液 0.1 mL/kg 肌肉注射,待小型猪肢体活动稳定后,取俯卧位固定于手术台上。呼吸面罩与麻醉呼吸机连接,吸入 5% 浓度的异氟烷进行麻醉诱导,当小型猪的四肢出现松弛、活动消失后,及时行气管内插管术,使用浓度为 0.5% 异氟烷进行麻醉维持。于其背部正中线两侧旁开 2 cm 分别用手术刀制备 3 个边长 5 cm、深达肌肉筋膜的正方形全层皮肤缺损创面,同侧创面间距 5 cm 以上。创面彻底清创止血后,用每 100 mL 含 24 万单位庆大霉素的无菌 0.9% 氯化钠溶液反复冲洗,0.9% 氯化钠溶液纱布覆盖备用。采用自体自身对照(图 1),实验组创面(创面 3、4、5、6)用无菌注射器均匀滴加重组人Ⅲ型胶原蛋白水溶液,迅速以无菌 10% Ca^{2+} 溶液雾化喷洒交联成凝胶状,水凝胶外层覆盖无菌硅胶膜保湿。阳性对照组(创面 2)覆盖可吸收性敷料,并将可吸收性敷料间断缝合在创面上。阴性对照组(创面 1)仅覆盖无菌硅胶膜。所有创面打包完毕后,无菌纱布覆盖,绷带缠绕固定。术毕,送回饲养房,术后连续 3 d 注射青霉素 40 万单位/只。本研究已通过海军军医大学动物中心伦理委员会审批(审批号:20180910058),并严格按照动物福利标准执行动物管理。

3. 标本收集:术后 7、14、21、90 d 分别打开创面,用直径为 1 mm 的取材器在每个创面均匀取 5 个深至肌层的、直径为 1 mm 的柱状组织块。用 10% 甲醛溶液固定组织块,常规石蜡包埋、切片,行苏木精-伊红染色、CD31 免疫组织化学染色和天狼猩红饱和苦味酸染色。

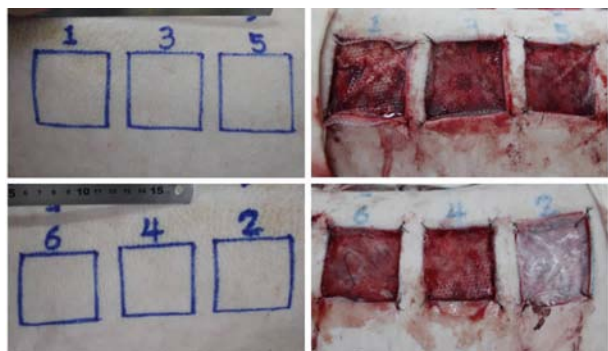


图 1 小型猪自体自身对照全层皮肤缺损创面

三、观察指标

1. 水凝胶微观形态结构观察:取交联后的水凝胶 3 块,冷冻干燥,常规方法喷金,用扫描电子显微镜观察材料的微观结构。

2. 创面大体观察:分别于术后 7、14、21、90 d 进行创面大体观察,观察创面有无渗液、出血及感染,创缘皮肤有无红肿,以及肉芽组织生长情况。

3. 组织学评价:(1)苏木精-伊红染色观察:光学显微镜下观察组织炎症反应、成纤维细胞数量、胶原排列情况和肉芽组织厚度。(2)CD31 免疫组织化学染色观察:阳性信号为定位于细胞质的棕黄色颗粒。新生毛细血管数的统计参照文献[7]的方法,于 40 倍镜下选择 CD31 阳性内皮细胞密度最高的区域,然后在 200 倍镜下计数毛细血管数目。镜下每个孤立可分的棕黄色内皮细胞或细胞团均记为 1 个毛细血管。记录 5 个视野,对阳性信号取平均值。(3)天狼猩红饱和苦味酸染色观察:普通光学显微镜下胶原纤维呈红色,细胞核呈绿色,其余呈黄色。普通光学显微镜下观察组织中胶原沉积部位。偏振光显微镜下区分 I 型、Ⅲ型胶原成分。I 型胶原纤维较为粗大,偏振光下呈亮黄、橙或红色粗纤维状;Ⅲ型胶原纤维较纤细,偏光下为细长的绿色纤维。

四、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计分析软件对实验数据进行处理,新生毛细血管数目为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布,方差齐,则多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验,反之采用 Kruskal Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、水凝胶的微观形态结构

扫描电子显微镜下观察水凝胶样品冷冻干燥后的形貌,如图 2 所示,水凝胶外表面呈现三维网状多孔结构,孔径在 100 ~ 200 μm 。

二、动物实验结果

1. 术后各组创面大体观察:术后 7 d,创面形成结痂,实验组创面肉芽组织生长平整,较阴性对照组新鲜湿润,触之易出血,无感染。术后 14 d,创面面积缩小,触之不易出血,实验组和阳性对照组创面开始收缩,阳性对照组较实验组收缩更加明显;术后 21 d,阴性对照组收缩情况较实验组和阳性对照组更加明显。术后 90 d,实验组和阳性对照组创面完全愈合,实验组创面区域质地柔软有弹性,阳性对照组创面区域质地坚韧,有明显瘢痕增生。阴性对照组仍残留一小块未愈创面,已愈合部分质地坚韧,有

明显瘢痕增生。见图3。

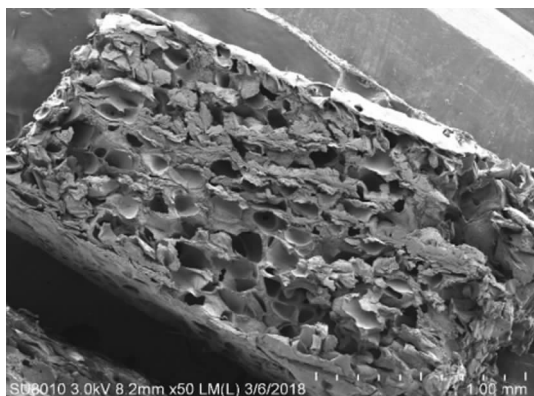


图2 扫描电子显微镜下重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶结构($\times 50$)

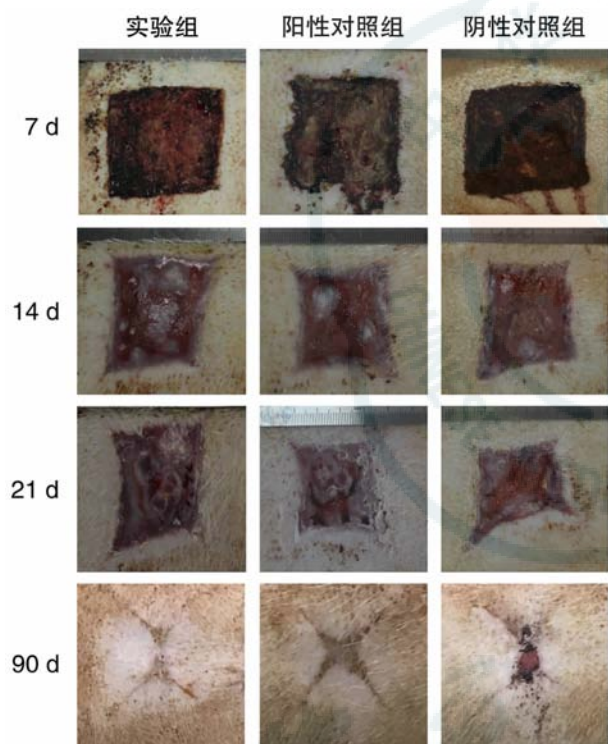


图3 术后不同时间点各组小型猪全层皮肤缺损创面大体观察

2. 术后各组苏木精-伊红染色结果: 术后7 d, 创面以炎性细胞为主。术后14 d, 创面可见新生肉芽组织, 大量成纤维细胞、炎性细胞浸润, 可见新生毛细血管; 术后21 d, 创面炎性细胞减少, 以成纤维细胞为主。术后90 d, 创面基本愈合, 实验组和阳性对照组表皮厚度较阴性对照组厚, 真皮层胶原排列更加有序。见图4。

3. 术后各组CD31免疫组织化学染色结果: 术后7、14和21 d, 实验组和阳性对照组创面组织CD31染色为强阳性, 而阴性对照组为弱阳性。其中, 术后7 d和14 d, 实验组新生毛细血管数分别为

(18.8 ± 2.7) 个/hpf 和 (32.0 ± 4.4) 个/hpf, 阳性对照组分别为 (28.6 ± 2.4) 个/hpf 和 (38.8 ± 3.3) 个/hpf, 而阴性对照组仅分别为 (12.0 ± 3.0) 个/hpf 和 (16.6 ± 2.3) 个/hpf, 实验组新生毛细血管数明显高于阴性对照组, 差异均有统计学意义(P 值均小于0.05)。术后21 d, 实验组新生毛细血管数目为 (42.8 ± 4.5) 个/hpf, 阳性对照组为 (48.6 ± 3.3) 个/hpf, 阴性对照组为 (12.6 ± 4.1) 个/hpf, 其中, 实验组与阳性对照组新生毛细血管数目差异无统计学意义($P=0.1417$), 而明显高于阴性对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。术后90 d, 创面毛细血管数量恢复到正常水平, 各组之间差异无统计学意义($P=0.8823$)。见图5、6。

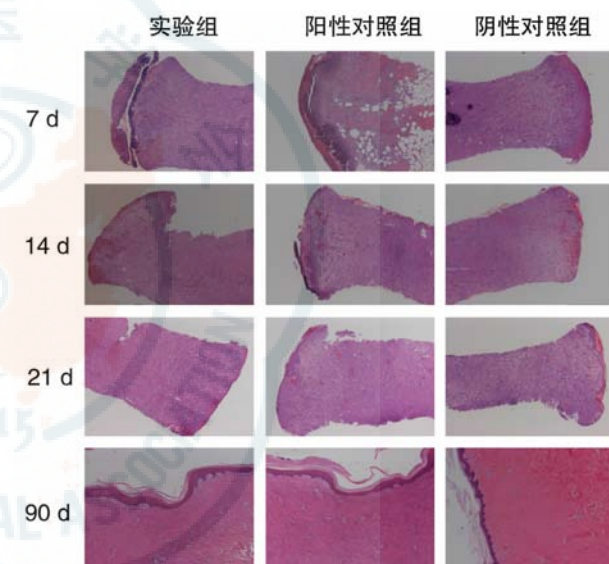


图4 术后不同时间点各组小型猪全层皮肤缺损创面苏木精-伊红染色结果观察($\times 50$)

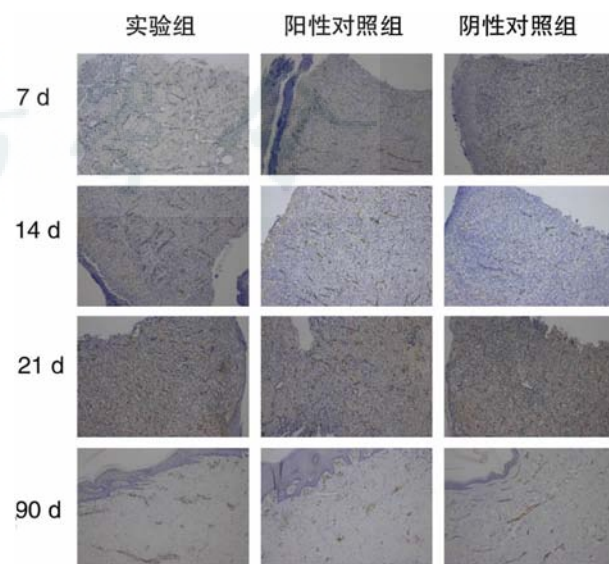


图5 术后不同时间点各组小型猪全层皮肤缺损创面组织CD31免疫组织化学染色观察($\times 200$)

4. 术后各组天狼猩红饱和苦味酸染色结果: 术后 7 d, 真皮修复过程刚刚开始, 各组创面胶原蛋白含量较少, 排列紊乱。术后 14 d 和 21 d, 实验组和阳性对照组胶原排列逐渐有序, 而阴性对照组胶原排列仍较紊乱, 实验组Ⅲ型胶原蛋白比例较阳性对照组和阴性对照组高。术后 90 d, 实验组真皮层胶原排列较阳性对照组和阴性对照组胶原排列更加规整, 且Ⅲ型胶原蛋白比例明显较阳性对照组和阴性对照组高; 阴性对照组胶原排列明显较实验组和阳性对照组紊乱。见图 7。

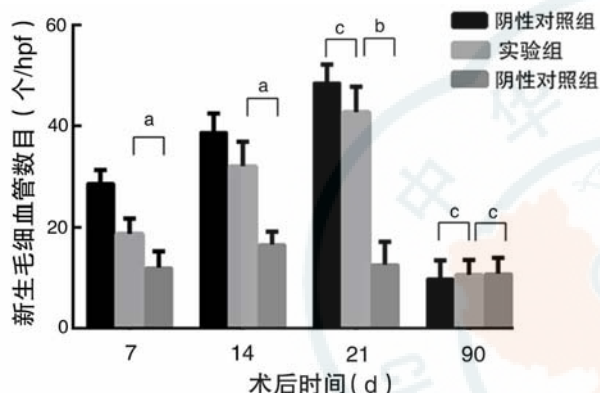


图6 术后不同时间点各组创面组织新生毛细血管数目的比较。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P > 0.05$

讨 论

真皮层是皮肤组织的重要组成部分, 与创面愈合后的皮肤弹性、耐磨性以及外观密切相关^[8-9]。大面积烧伤患者由于自体皮缺乏, 常采用网状皮、邮票皮或微粒皮移植, 上述缺乏真皮结构的刃厚皮片会导致创面愈合过程中局部大量成纤维细胞增生, 分泌不成熟细胞外基质, 愈合后创面瘢痕增生, 起疱破溃甚至功能障碍^[10-12]。为提高创面的愈合质量, 真皮替代物成为皮肤组织工程研究的热点, 目前该领域的研究重点多集中在真皮支架方面(主要包括脱细胞真皮支架和生物材料合成真皮支架)^[13]。但脱细胞真皮支架可能引起一定的免疫反应^[14], 而利用酸、碱水解法从动物结缔组织中提取胶原蛋白制备的生物材料合成真皮支架存在疫病传播的风险, 且可吸收性敷料等真皮支架用于创面修复需要进行二次植皮手术, 既增加了患者的痛苦, 又因价格昂贵, 难以大面积使用。而创面敷料与真皮支架相比, 临床使用更加方便, 如能起到促进真皮修复的作用, 将比真皮支架更具优势。本研究制备的重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶可促进创面血管新生, 从而加快创面愈合过程, 还能促进新生真皮组织胶原纤维有序排列, 有望减轻瘢痕增生。此外, 与真皮支架相

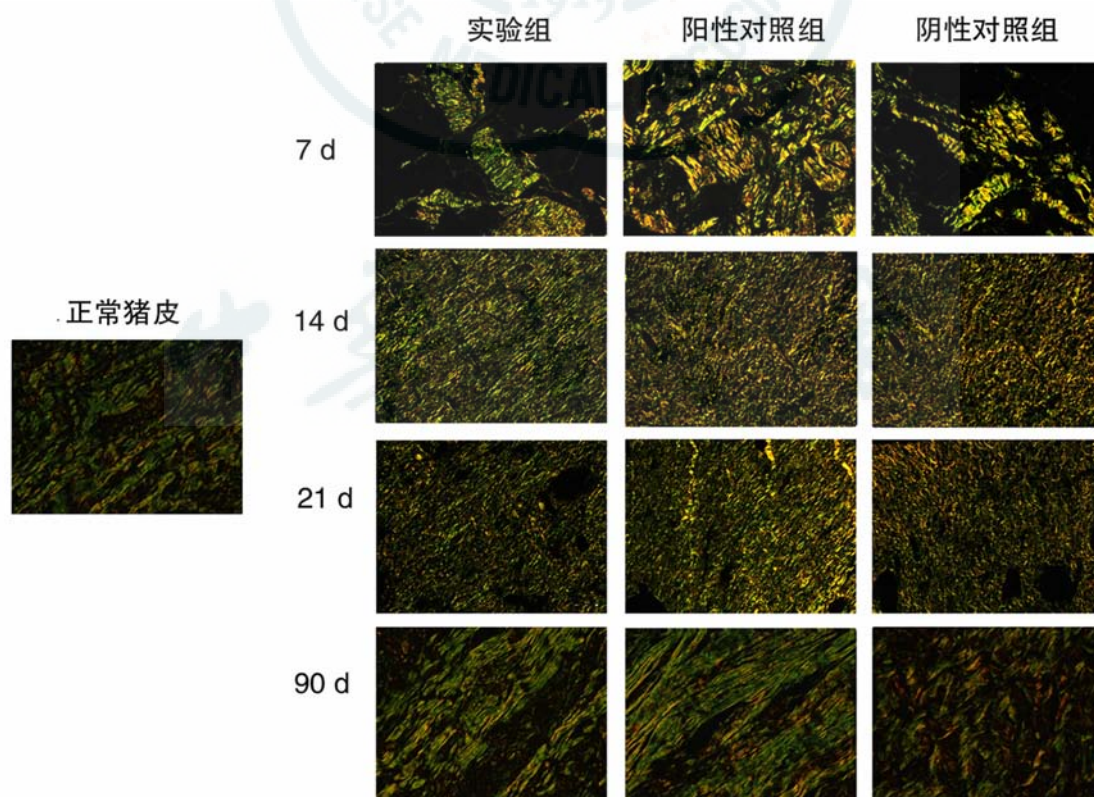


图7 正常猪皮与术后不同时间点各组小型猪全层皮肤缺损创面组织胶原蛋白的比较(天狼猩红饱和苦味酸染色, $\times 200$)

比,重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶敷料还具有以下优势:(1)制备水凝胶所用的胶原蛋白为通过基因工程生产的重组人Ⅲ型胶原蛋白,与从动物结缔组织中提取的胶原蛋白相比,在分子结构和性能上与人体自身的胶原蛋白更加接近,避免了疫病传播问题,且成本低廉,易于产业化生产。(2)Willard等^[15]的研究表明,类人源胶原蛋白在促进人原代细胞附着和增殖方面与牛胶原相比有同等或更佳的作用,且引起免疫排斥反应的可能性更低。(3)本研究所用的重组Ⅲ型人胶原蛋白在基因构建时选择性表达亲水氨基酸,因而水溶性极佳,可制备高浓度胶原蛋白含水量凝胶,工艺简单,且能与其他高分子材料共同制备性能更优的复合水凝胶材料。(4)水凝胶材料与固态真皮支架相比,具有与创基无缝隙紧密贴合,不形成死腔的优点。(5)本研究发现,重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶敷料可在真皮层重建过程中提高Ⅲ型胶原比例,有望改善创面愈合后皮肤的弹性,减少瘢痕增生。

本研究利用重组人Ⅲ型胶原蛋白制备了一种工艺简单,可快速成型,使用方便,生产成本较低的水凝胶敷料,并发现其在修复猪全层皮肤缺损创面的过程中可促进血管新生,加快愈合过程;促进新生真皮组织胶原有序排列,从而减轻瘢痕增生;增加Ⅲ型胶原蛋白在新生真皮中所占比例,有望增加愈合后创面皮肤的弹性。由于具有上述诸多优势,笔者认为重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶敷料未来有望成为一种新型的烧伤创面修复材料。本研究为动物试验研究,其结论能否在临床中获得一致的效果,需通过严谨的临床试验进行补足说明。笔者下一步的研究方向是通过临床研究,深入探索重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶敷料促进全层创面愈合的作用,并进一步评价创面愈合后的瘢痕指标。

参 考 文 献

- [1] Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. 1962 [J]. J Wound Care, 1995, 4(8): 366-367.

- [2] Hinman CD, Maibach H. Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds[J]. Nature, 1963, 200: 377-378.
- [3] Song A, Rane AA, Christman KL. Antibacterial and cell-adhesive polypeptide and poly(ethylene glycol) hydrogel as a potential scaffold for wound healing[J]. Acta Biomater, 2012, 8(1): 41-50.
- [4] Purna SK, Babu M. Collagen based dressings--a review[J]. Burns, 2000, 26(1): 54-62.
- [5] 王晓芹,王贵波,李晓辉. 创面敷料及其对愈合的影响研究进展[J]. 中国临床康复, 2002, 6(4): 574-575.
- [6] Leung A, Crombleholme TM, Keswani SG. Fetal wound healing: implications for minimal scar formation[J]. Curr Opin Pediatr, 2012, 24(3): 371-378.
- [7] Weidner N, Carroll PR, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma[J]. Am J Pathol, 1993, 143(2): 401-409.
- [8] Shahrokhi S, Arno A, Jeschke MG. The use of dermal substitutes in burn surgery: acute phase[J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(1): 14-22.
- [9] Haifei S, Xingang W, Shoucheng W, et al. The effect of collagen-chitosan porous scaffold thickness on dermal regeneration in a one-stage grafting procedure[J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2014, 29: 114-125.
- [10] Machens HG, Berger AC, Mailänder P. Bioartificial skin[J]. Cells Tissues Organs, 2000, 167(2/3): 88-94.
- [11] Nelson CV, Miller SF, Eppinger M, et al. Micrografts. II: Evaluation of 25:1, 50:1, and 100:1 expansion skin grafts in the porcine model[J]. J Burn Care Rehabil, 1995, 16(1): 31-35.
- [12] Chen XL, Xia ZF, Fang LS, et al. Co-graft of acellular dermal matrix and autogenous microskin in a child with extensive burns[J]. Ann Burns Fire Disasters, 2008, 21(2): 102-106.
- [13] 周红梅,吕国忠. 组织工程皮肤的研究新进展[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2010, 5(4): 532-537.
- [14] Lucke S, Hoene A, Walschus U, et al. Acute and chronic local inflammatory reaction after implantation of different extracellular porcine dermis collagen matrices in rats[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 938059.
- [15] Willard JJ, Drexler JW, Das A, et al. Plant-derived human collagenscaffolds for skin tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(13/14): 1507-1518.

(收稿日期:2019-02-07)

(本文编辑:谷俊朝)

刘彤,郑兴锋,李海航,等. 重组人Ⅲ型胶原蛋白水凝胶对猪全层皮肤缺损创面修复的影响[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2019, 14(2): 97-102.